III ผลการทดลอง

3.1 การทดลองหาความเข้มข้นของสารที่จะใช้ทดลองให้เหมาะสม เพื่อให้ความไวและความถูกต้องในการวัดโดยวิธีนี้มีค่าสูง

การวัดปริมาณฮอร์โมนธัยรอกซินโดยวิธี saturation analysis(Ekins, 1969) ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนที่จะใช้ในการจับฮอร์โมนที่จะวัด, ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่จะใช้ รวมทั้งความเข้มข้นของ tracer ของฮอร์โมนด้วย จะต้องให้เหมาะสมกับปริมาณที่จะใช้วัดปริมาณฮอร์โมนนั้น ๆ ด้วย

จากการเริ่มต้นสมมุติฐานว่า ใช้วิธีตามหลักของ Ekins ทดลองกับธัยรอกซินมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0 นาโนกรัม ต่อ 0.5 มล. และใช้โปรตีนที่ได้จากซีรัมของลูกท้องในการทำปฏิกริยาด้วย โดยเจือจางด้วย barbital buffer pH= 8.6 ในอัตราส่วน 1:3 แล้วเติมลงในฮอร์โมนธัยรอกซินมาตรฐาน (ซึ่งมีอยู่ในหลอดทดลองความเข้มข้นละ 2 หลอด หลอดละ 0.5 มล.) หลอดละ 60 ไมโครลิตร แล้วจึงเติม tracer $^{125}I - T_4$ หลอดละ 10 ไมโครลิตร (มีความเข้มข้น 0.2 นาโนกรัม) อินคิวเบท 1 ชั่วโมงที่ 4°ซ. เติมเรซิน 150 มก. เขย่า 45 นาที ที่ 4°ซ. แยก supernatant ออกจากเรซิน วัดกัมมันตภาพรังสี หาอัตราส่วน f ต่อ b และ b ต่อ f ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และแสดงกราฟมาตรฐานในรูปที่ 5 ก. และ 'scatchard plot' ในรูปที่ 5ข. หาความชัน (slope) ของกราฟในรูป 5 ข. มีค่า = 0.8 =K มี intercept = 3.5 จากนั้น นำค่าความชันของกราฟ 'scatchard plot' ไปคำนวณหาค่า $\epsilon\sqrt{STV/K}$

เมื่อ ϵ = Statistic variation of duplication = 0.0089

S = specific activity ของtracer = 17000 count/min/ng

T = เวลาที่ใช้ในการนับ sample ทั้งสองส่วน = 40 นาที

V = ปริมาตรที่ใช้ทั้งหมดในการอินคิวเบท = 0.6 มล.

ดังนั้น $\epsilon\sqrt{STV/K} = 0.0089\sqrt{\frac{17000 \times 40 \times 0.6}{0.8}} = 6.35$

เมื่อนำค่านี้ไปอ่านค่า Kp และ Kq จากกราฟรูปที่ 3 'computor plot' จะได้ค่า Kp = 0.55 $\therefore$ P หรือ tracer มีค่า = $\frac{Kp}{K} = \frac{0.55}{0.8} = 0.7$ และได้ค่า Kq = 1.27 $\therefore$ binding protein = $\frac{Kq}{K} = \frac{1.27}{0.8} = 1.6$

จะเห็นได้ว่าจากการทดลองเติม tracer $^{125}I\text{-}T_4$ 10 ไมโครลิตรและมีความเข้มข้น0.2 นาโนกรัมนั้น พบว่าจากการคำนวณค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วจะต้องใช้ tracer = 0.7 นาโนกรัม แสดงว่า tracer ที่ใช้ควรเพิ่มเป็น 3 เท่าของที่ใช้เดิม คือ 30 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 0.6 นาโนกรัม)

จากกราฟรูปที่ 5 ข. จะพบว่าค่า intercept = ค่า binding protein จากการทดลองมีค่า = 3.5 แต่จากการคำนวณพบว่าค่าความเข้มข้นของ binding protein ที่เหมาะสมกับวิธีนี้ มีค่า =1.6 เท่านั้น ดังนั้นจะเห็นว่าความเข้มข้นของ binding protein ที่ใช้ควรเจือจางลงอีกด้วย barbital buffer (pH 8.6) เท่าตัวคือเจือจางลงเป็น 1:5 หรือ 1:6 ก็จะได้ความเข้มข้นเจือจางพอเหมาะสำหรับวิธีนี้ ขอมูลต่าง ๆ จะแสดงไว้ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วน f ต่อ b กับปริมาณฮอร์โมนที่ถูกจับได้ ของชัยรอกซินมาตรฐาน เพื่อทำ 'scatchard plot'

ปริมาณชัยรอกซิน (นาโนกรัม/0.5 มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	อัตราส่วน b ต่อ f		%statistical error	T_4 bound = $\frac{RT}{R+1}$
50.20	2096	285	7.35	0.1360	0.1358	0.14	6.00
	2170	294	7.38	0.1355			
25.20	2057	435	4.72	0.2114	0.2147	1.07	4.45
	2074	452	4.59	0.2179			
12.70	1889	705	2.68	0.3732	0.3696	0.97	3.42
	1915	701	2.72	0.3660			
6.45	1516	1064	1.42	0.7018	0.6927	1.30	2.64
	1514	1035	1.46	0.6836			
3.32	1180	1441	0.82	1.2212	1.2276	0.43	1.83
	1175	1450	0.80	1.2340			
1.76	1099	1506	0.72	1.3703	1.3879	1.27	1.02
	1105	1553	0.71	1.4054			
0.20	981	1536	0.51	1.5657	1.5831	1.09	0.12
	1001	1602	0.62	1.6004			
					เฉลี่ย	0.89	

หมายเหตุ sensitivity = $\frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$ (Ekins, 1969)

ปริมาณชัยรอกซิน มีสัญญลักษณ์ = T

กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา = f หน่วยเป็น count per minute

กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา = b หน่วยเป็น count per minute

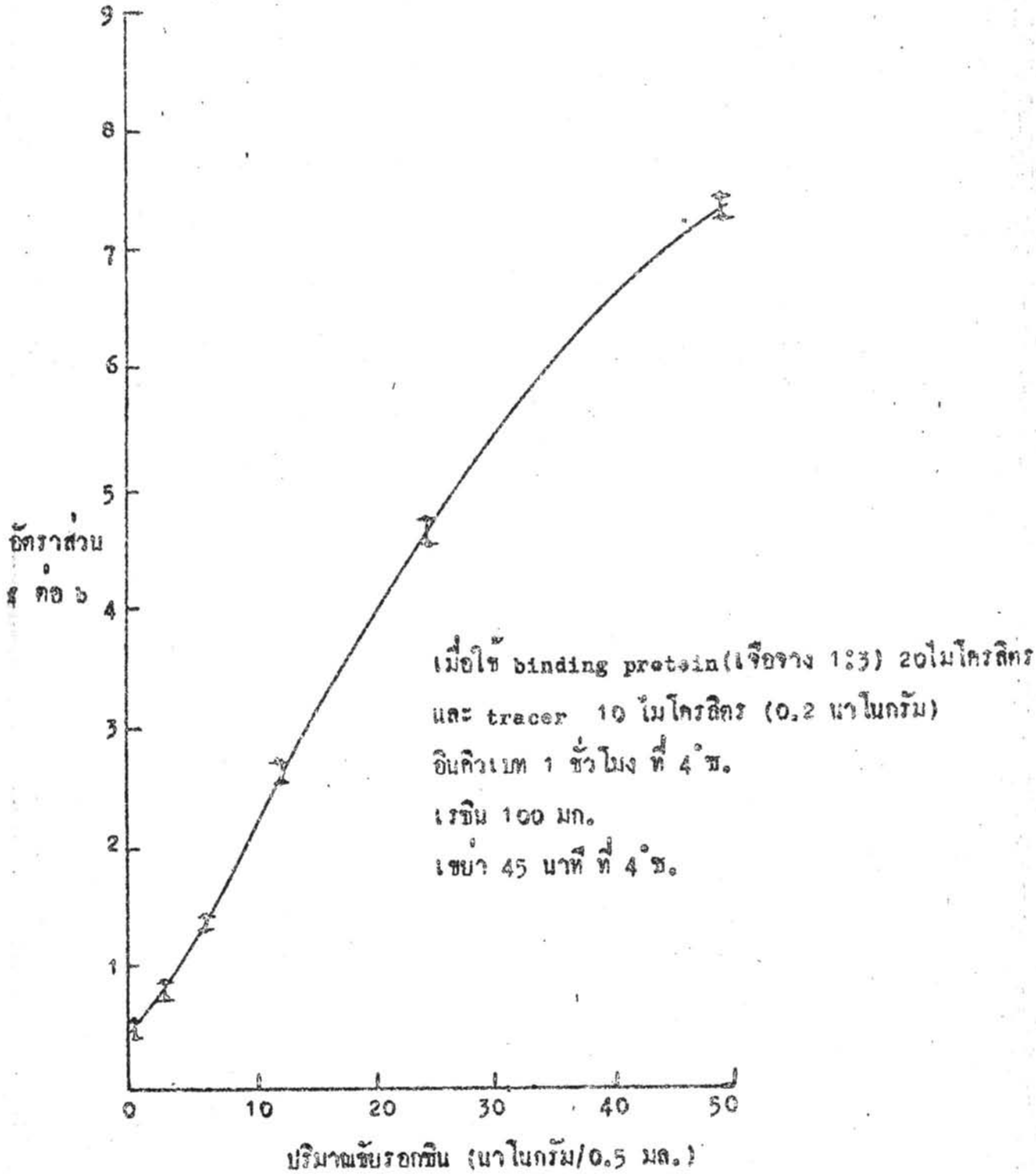
อัตราส่วน f ต่อ b = R

ความชันของกราฟรูปที่ 5 ก. ที่ความเข้มข้นเท่ากับศูนย์ = 0.17

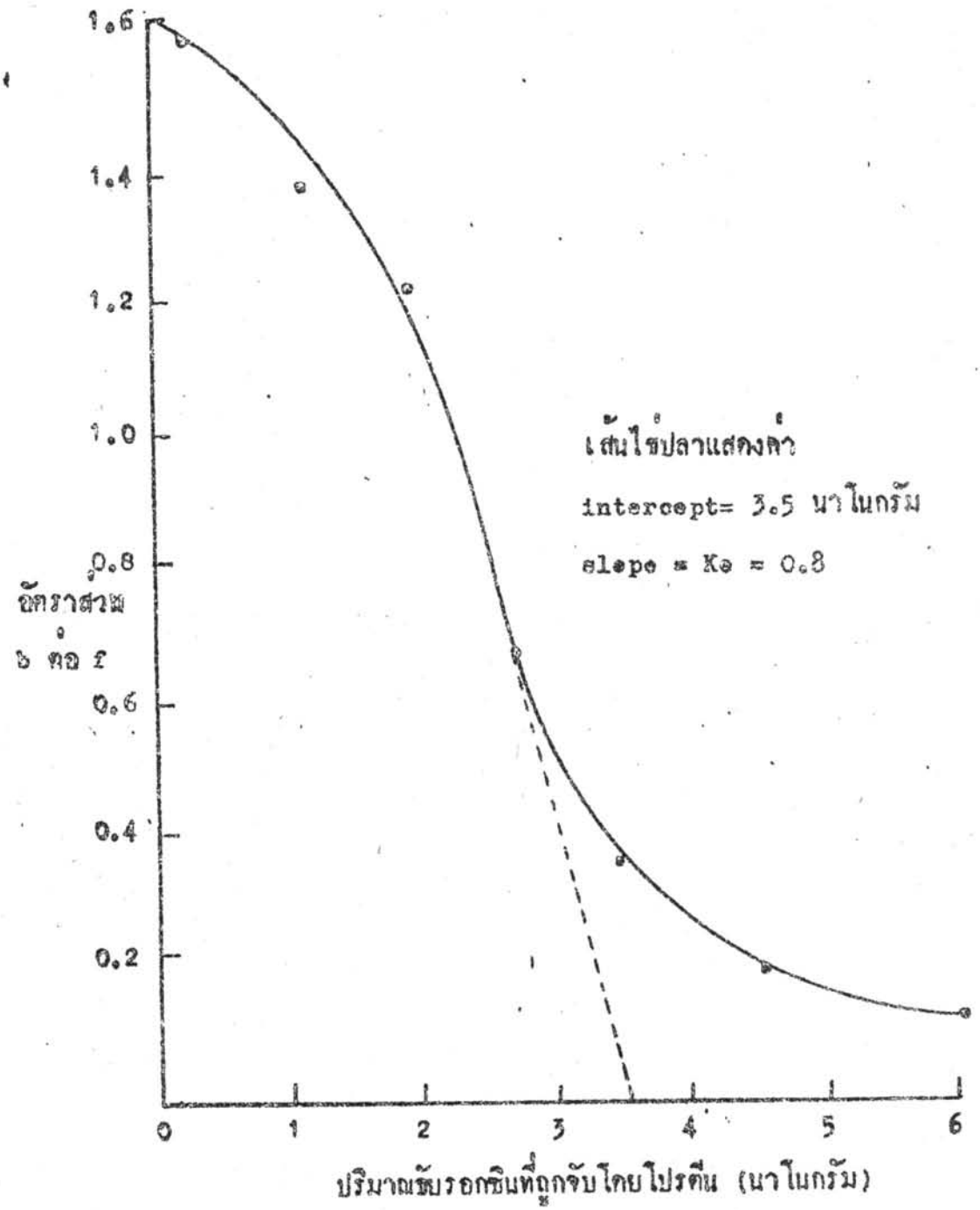
sensitivity $= \frac{0.0089 \times 1000}{0.17 \times 0.5}$

$= 104.94$ พิโคกรัม/มล.

รูปที่ 5 ก. กราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณอินซูลิน



รูปที่ 5 ข. 'scatchard plot' แสดงค่า K และปริมาณยับยั้งอินซูลินที่ถูกจับโดยโปรตีน



หลังจากการแก้ไขการทดลองโดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ tracer $^{125}I\text{-}T_4$ และการเจือจาง binding protein ตามที่หาไว้ข้างต้นเพื่อหาความไวและความถูกต้องของการวัดให้มีค่าสูง ก็นำมาทดลองกับ ฮอร์โมนมาตรฐานอีกครั้งกับชุดรอกซีนความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 50,25,12.5,6.25,3.125, 1.5625, 0 นาโนกรัม/0.5 มล. เติม tracer $^{125}I\text{-}T_4$ 10 ไมโครลิตร (มีความเข้มข้น 0.2 นาโนกรัม) binding protein (เจือจาง 1:5; บีรัม: buffer) 60 ไมโครลิตร อินคิวเบท 1 ชั่วโมง ที่ 4°ซ. เติมเรซิน 150 มก. เขย่า 45 นาทีที่ 4°ซ. แยก supernatant ออกจากเรซิน วัดกัมมันตภาพ ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 และรูปที่ 6 ก.และ 6ข. หาความชันของกราฟ 'scatchard plot' ในรูปที่ 6 ข. มีค่า= 0.7 ซึ่งเป็นค่า K(equilibrium constant)สำหรับปฏิกริยาและ intercept=1.65 ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของbinding protein จากนั้นนำค่าความชันของกราฟไปคำนวณ $\epsilon\sqrt{STV/K}$

เมื่อ $\epsilon = 0.0165$; $S = 20000$ count/min./ng ; $T = 40$ นาที

$V = 0.6$ มล.

$$\epsilon\sqrt{STV/K} = 0.016\sqrt{\frac{20000 \times 40 \times 0.6}{0.7}} = 20.2$$

เมื่อนำจำนี้ไปอ่านค่า Kp และ Kq จากกราฟรูปที่ 3 'computer plot' จะได้ค่า

Kp = 0.17 $\therefore$ P หรือ tracer มีค่า $\frac{Kp}{K} = \frac{0.17}{0.7} = 0.24$

Kq = 1.05 $\therefore$ q หรือ binding protein = $\frac{Kq}{K} = \frac{1.05}{0.7} = 1.5$

จะเห็นว่าค่า tracer hormone ที่ใส่ 10 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 0.2 นาโนกรัม) ใกล้เคียงกับค่าที่คำนวณได้คือ 0.24 นาโนกรัม และความเข้มข้นของ binding protein จากการทดลอง = 1.65 แต่จากการคำนวณมีค่า = 1.5 ซึ่งจะเห็นว่ามีผลใกล้เคียงกัน ดังจะแสดงผลให้ดูในตารางที่ 2 และรูปที่ 6 ก. และ 6 ข.

ตารางที่ 2 แสดงอัตราส่วน f ต่อ b และปริมาณฮอร์โมนที่ถูกจับโดยโปรตีน เพื่อทำ 'scatchard plot' เพื่อทำที่ความเข้มข้นของสารที่เหมาะตามที่หาได้

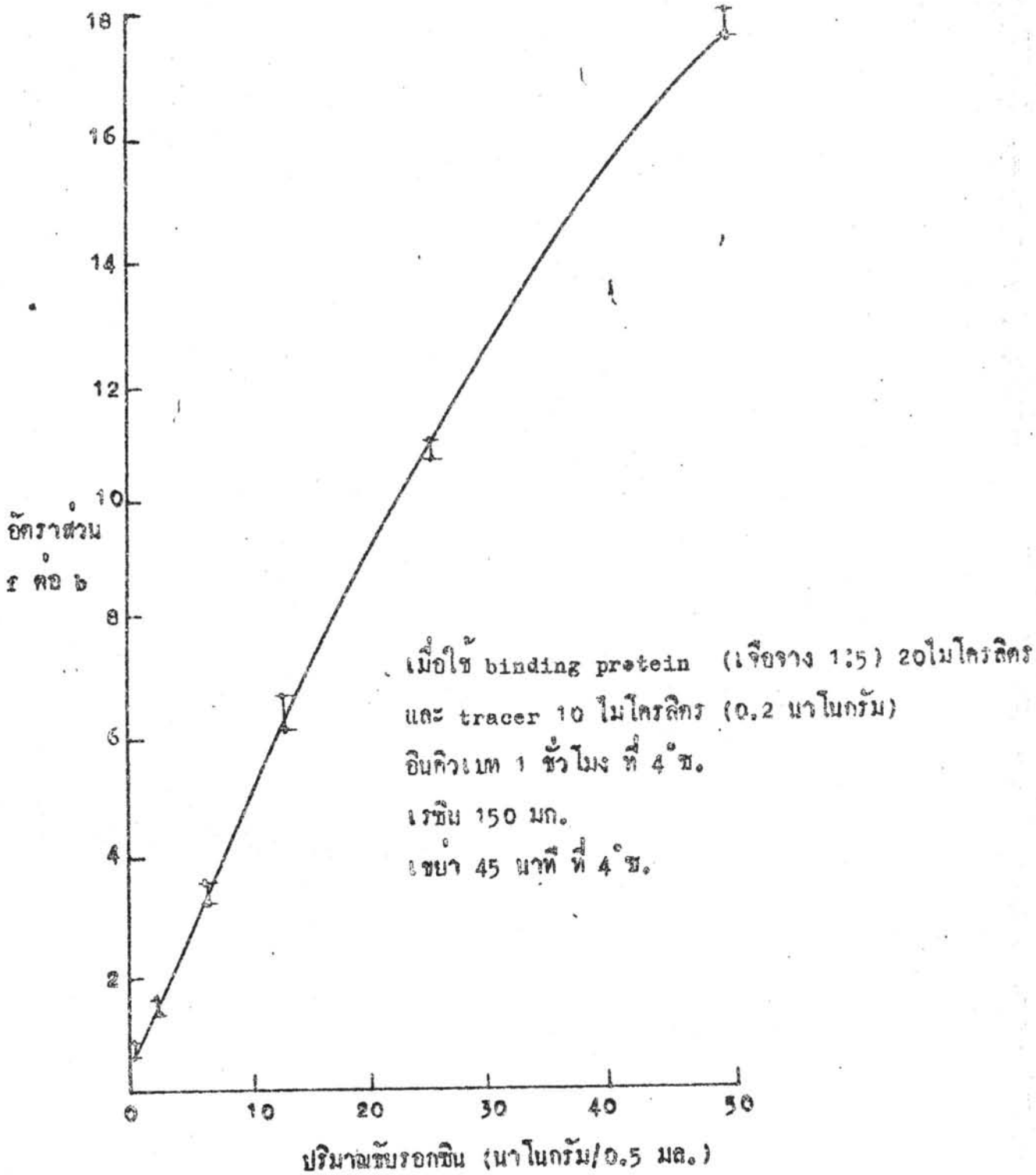
ปริมาณฮอร์โมนมาตรฐาน (นาโนกรัม/0.5 มล.)	กัมมันตภาพสวนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	อัตราส่วน b ต่อ f		%statistical error	ปริมาณฮอร์โมนที่ถูกฮอร์โมนจับ = $\frac{RT}{R+1}$
50.20	3352	185	18.10	0.0552	.0557	0.95	2.65
	3676	207	17.75	0.0562			
25.20	3626	333	10.90	0.0918	.0917	0.00	2.11
	3693	338	10.90	0.0915			
12.70	3606	532	6.78	0.1475	.1542	3.53	1.69
	3523	567	6.22	0.1609			
6.45	3251	928	3.50	0.2854	.2903	2.63	1.46
	3180	956	3.33	0.3006			
3.32	2700	1484	1.82	0.5496	.5853	2.66	0.86
	2786	1452	1.92	0.5211			
1.76	2446	1452	1.34	0.7460	.7585	0.75	0.63
	2490	1902	1.31	0.7710			
0.20	2157	2108	1.02	0.9774	.9941	1.00	0.09
	2097	2120	0.99	1.0109			
					เฉลี่ย	1.65	

ความชันของกราฟรูปที่ 5 ข. = 0.43

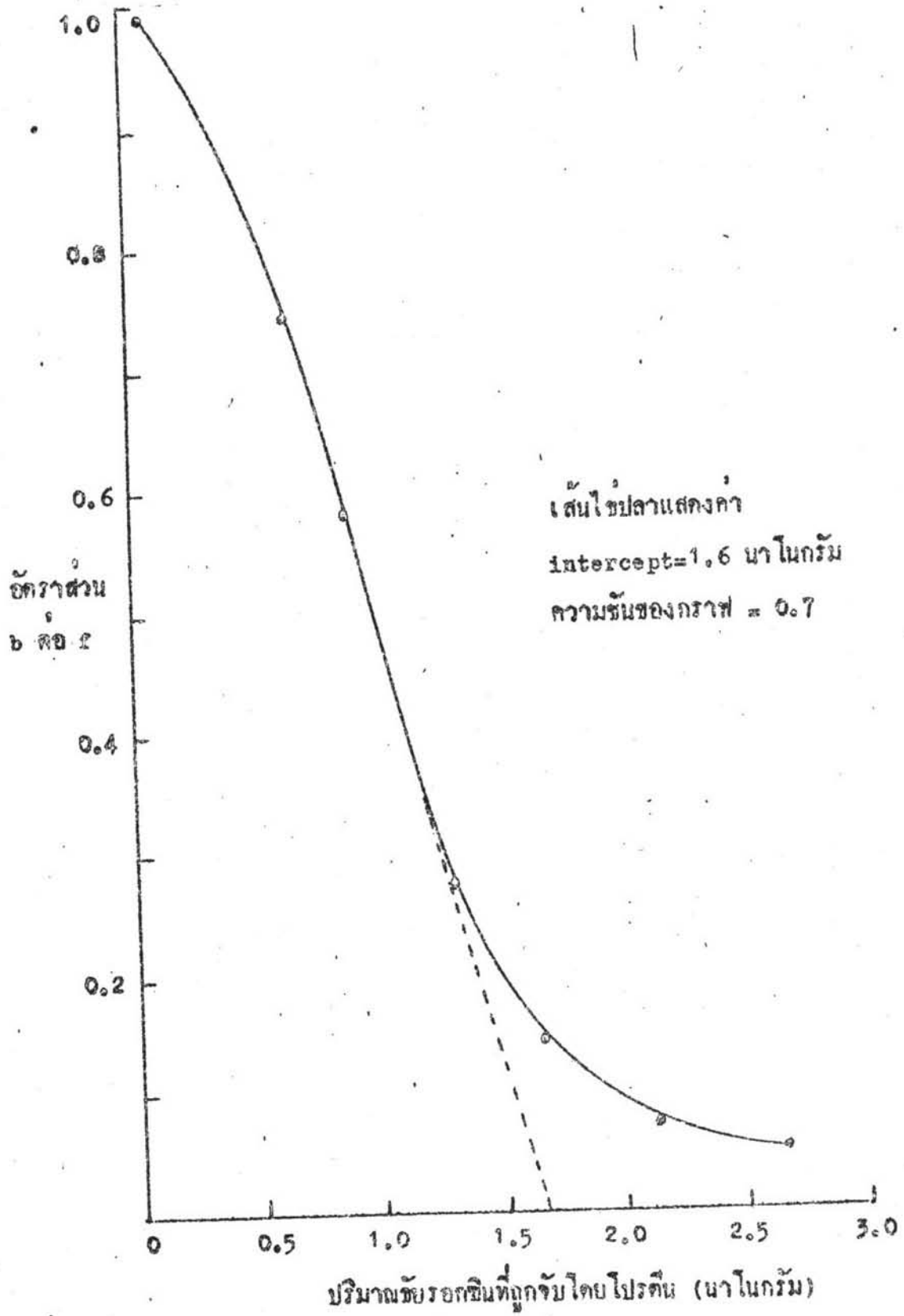
sensitivity = $\frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

= $\frac{0.0165 \times 1000}{0.43 \times 0.5}$ = 70.70 พิโคกรัม/มล.

รูปที่ 6 ก. แสดงกราฟ มาตรฐานสำหรับวัดปริมาณอินซูลินเมื่อใช้กับสารที่มีความเข้มข้นที่พอเหมาะตามที่คำนวณไว้แล้ว



รูปที่ 6 ข. 'scatchard plot' แสดงค่า K และปริมาณฮอร์โมนที่ถูกจับโดยโปรตีน เมื่อมี optimum concentration



3.2 ผลการปรับปรุงวิธีวัดปริมาณฮอร์โมนโดยวิธี saturation analysis เพื่อให้มีความไวและความถูกต้องในการวัดมีค่าสูง โดยการแปรค่าแฟคเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้

3.2.1 ผลการ calibrate กราฟมาตรฐานเมื่อแปรค่าน้ำหนักเรซิน จากการใช้ฮอร์โมนธัยรอกซินมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ความเข้มข้นละ 2 หลอด เริ่มจาก 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 และ 0 นาโนกรัม/0.5 มล. ทำเป็น 5 ชุด แต่ละหลอดเติม tracer $^{125}I - T_4$ 10 ไมโครลิตร และ binding protein (เจือจาง 1:5; ซีรัม : buffer) 20 ไมโครลิตร อินคิวเบท 1 ชั่วโมง ที่ 4°ซ เติมเรซินขนาดน้ำหนักต่าง ๆ กัน ในแต่ละชุดคือ 150, 120, 100, 80 และ 50 มก. ตามลำดับ แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 45 นาที ที่ 4°ซ. แยก supernatant ออกจากเรซิน วัดกัมมันตภาพทั้ง 2 ส่วน ผลที่ได้แสดงอัตราส่วนของส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (f) และส่วนที่ทำปฏิกริยา (b) และ standard error ไว้ในตารางที่ 3 ก, ข, ค, ง, จ และเขียนกราฟแต่ละชุดเมื่อใช้ขนาดเรซินต่าง ๆ กันในรูปที่ 7

จะเห็นว่าการใช้ปริมาณเรซินมากขึ้นจะทำให้ค่า f (ส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา) มีค่าสูงขึ้น ทำให้อัตราส่วน f กับ b มีค่าสูงขึ้น และกราฟที่ใช้เรซินตั้งแต่ใช้ขนาดเรซิน 150, 120, 100, 80 มก. จะมี standard error น้อย เฉพาะอย่างยิ่งที่ใช้ 100 มก. และค่าความไวของการวัด (sensitivity) เมื่อใช้ปริมาณเรซิน 100, 80, 50 มก. จะดีกว่าเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้เรซิน 80 มก. จะมี sensitivity = 199 พิโคกรัม*/มล. และกราฟที่ใช้ปริมาณเรซิน 100 หรือ 80 มก. จะมีส่วนแปรค่าในช่วงปริมาณธัยรอกซิน 0-25 นาโนกรัม/0.5 มล. ที่เหมาะสมในการใช้วัดได้ดีด้วย จึงพอสรุปได้ว่าปริมาณเรซินที่ใช้ควรจะเลือกใช้ระหว่าง 80 ถึง 100 มก.

---

*1 พิโคกรัม (picogram) = 10^{-9} มก.

ตารางที่ 3 ก. แสดงอัตราส่วน f ต่อ b ที่ใช้น้ำหนักเรซิน 150 มก., statistical error และ sensitivity

ปริมาณซัยรอกซิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา(cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	12229	1274	9.60	9.60	0.00
	12917	1352	9.60		
25.00	12431	2031	6.15	6.07	1.13
	12703	2117	6.00		
12.50	11735	2842	4.15	4.06	1.90
	10847	2735	3.98		
6.25	9912	3730	2.66	2.78	4.31
	12564	4334	2.90		
0.00	6825	7091	0.93	0.92	1.08
	6879	7145	0.91		
				เฉลี่ย	1.68

จากกราฟของข้อมูลในตาราง 3 ก. จะวัดความชันของกราฟได้ = 0.25

คำนวณหา sensitivity เป็นพิโคกรัมต่อ มล.

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$$

$$= \frac{0.0168 \times 1000}{0.25 \times 0.5} = 134.4 \text{ พิโคกรัม/มล.}$$

ตารางที่ 3 ข. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b ที่ใช้น้ำหนักเรซิน 120 มก.,statistical error และsensitivity

ปริมาณอินซูลินรอกซิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา(cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา(cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	f ต่อ b เฉลี่ย	%statistical error
50.00	12732	1732	7.35	7.35	0.00
	13122	1786	7.35		
25.00	11745	2099	5.60	5.70	1.70
	11770	2017	5.81		
12.50	11256	2656	4.25	4.35	2.29
	11627	2614	4.45		
6.25	10011	3708	2.73	2.82	3.50
	10549	3599	2.92		
0.00	6955	6243	1.12	1.14	0.01
	7494	6347	1.15		
				เฉลี่ย	1.49

จากกราฟรูปที่ 7 ของข้อมูลในตาราง 3 ข. จะวัดความชันของกราฟได้ = 0.23

คำนวณหา sensitivity $= \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.0149 \times 1000}{0.23 \times 0.5} = 129.6$ พิโคกรัม/มล.

ตารางที่ 3 ค. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b ที่ใช้น้ำหนักเรซิน 100 มก.,statistical error และ sensitivity

ปริมาณซัยรอกซิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	12425	1750	7.10	7.15	0.69
	12932	1801	7.20		
25.00	11813	2161	5.45	5.45	0.00
	11820	2177	5.45		
12.50	11029	2384	4.65	4.70	1.06
	11442	2405	4.75		
6.25	10316	4200	2.43	2.40	1.20
	10002	4201	2.38		
0.00	6104	6485	0.94	0.94	0.53
	6178	6648	0.93		
				เฉลี่ย	0.69

จากกราฟรูปที่ 7 ของข้อมูลในตาราง 3 ค. จะวัดความชันของกราฟได้ = 0.22

คำนวณหา $$\text{sensitivity} = \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$$

$$= \frac{0.0069 \times 1000}{0.22 \times 0.5} = 62.8 \text{ พิโคกรัม/มล.}$$

ตารางที่ 3 ง. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b ที่ใช้น้ำหนักเรซิน 80 มก.,statistical error และ sensitivity

ปริมาณเซียรอกซิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	12496	1850	6.70	6.77	1.03
	12349	1809	6.85		
25.00	11783	2806	5.53	5.65	2.10
	11681	2024	5.77		
12.50	10420	2871	3.64	3.55	2.50
	10598	3065	3.46		
6.25	10818	3673	2.96	2.99	1.00
	10605	3511	3.02		
0.00	7668	6636	1.16	1.19	2.50
	8087	6391	1.23		
				เฉลี่ย	1.17

จากกราฟรูปที่ 7 ของข้อมูลในตารางที่ 3 ง. จะวัดความชันของกราฟได้ = 0.18

คำนวณหา $\text{sensitivity} = \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.0117 \times 1000}{0.18 \times 0.5} = 199$ พิโคกรัม/มล.

ตารางที่ 3 จ. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b ที่ใช้น้ำหนักเรซิน 50 มก.,statistical error และ sensitivity

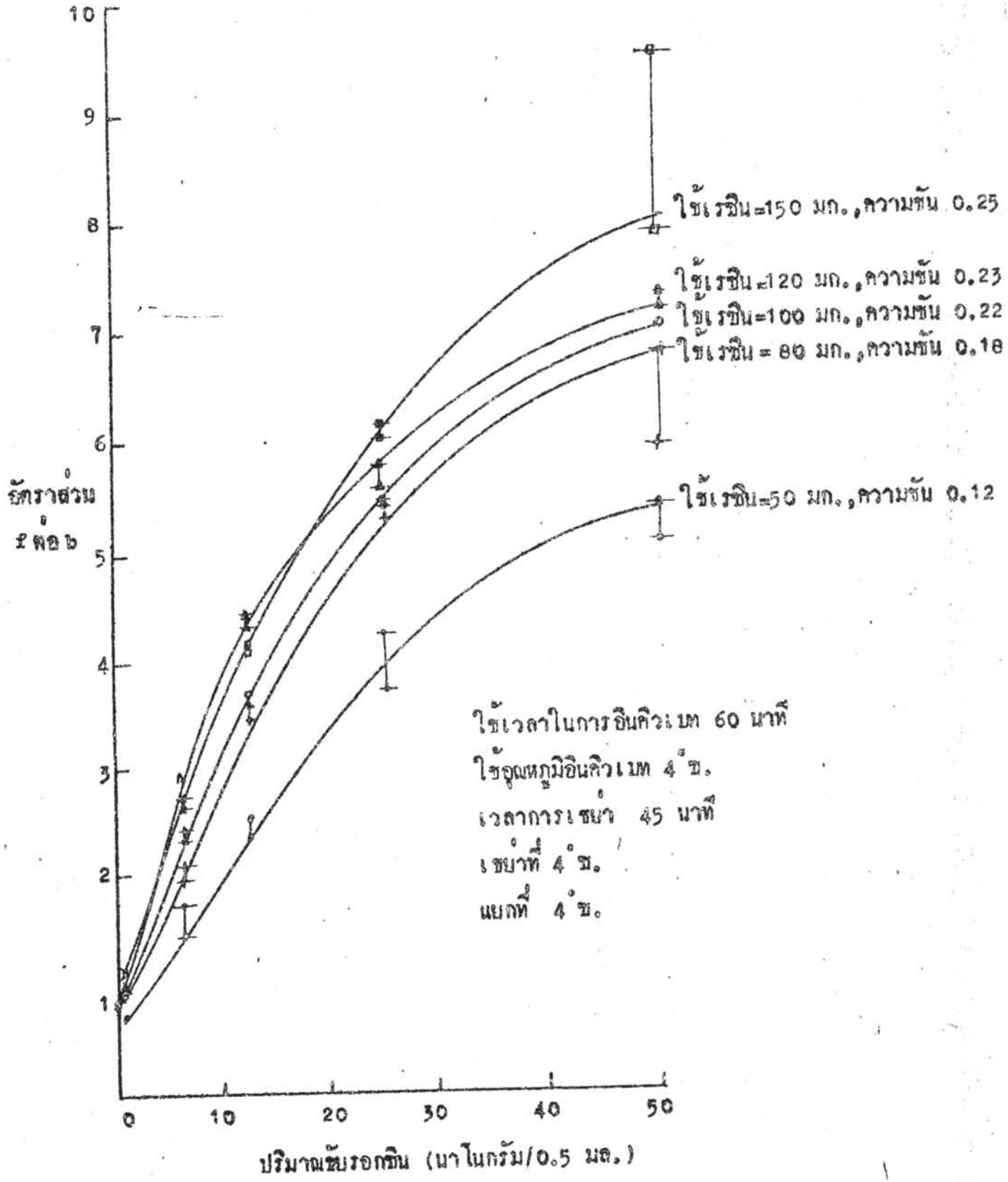
ปริมาณซัยรอกซิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	12317	2265	5.45	5.31	6.20
	12450	2406	5.13		
25.00	11805	2782	4.25	4.01	6.23
	11283	3019	3.76		
12.50	10831	4183	2.56	2.44	4.99
	9352	4016	2.33		
6.25	10103	5786	1.74	1.75	0.28
	8773	5312	1.75		
0.00	6327	8385	0.76	0.75	1.30
	6220	8398	0.74		
				เฉลี่ย	3.06

จากกราฟรูปที่ 7 ของข้อมูลในตารางที่ 3 จ. จะวัดความชันของกราฟได้ = 0.12

คำนวณหา $\text{sensitivity} = \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.0306 \times 1000}{0.12 \times 0.5} = 510$ พิโคกรัม/มล.

รูปที่ 7 กราฟแสดงความแตกต่าง เมื่อใช้น้ำหนักเรซินหนัก 150,120,100,80 และ 50 มก.ในการแยก free ออกจาก bound



3.2.2 ผลการ calibrate กราฟมาตรฐาน เมื่อแปรค่าเวลาการอินคิวเบท

การทดลองทำกับชัยรอกซินมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เริ่มตั้งแต่ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 และ 0 นาโนกรัม/0.5 มล.และทำเป็น 4 ชุด และแต่ละหลอดเติม tracer ^{125}I-T_4 10 ไมโครลิตร และ binding protein (เจือจาง 1:5,บีรัม : buffer)20 ไมโครลิตร อินคิวเบท 4°ซ.แต่ใช้เวลาต่างกันแต่ละชุดคือ 60, 45,30,15 นาที แล้วเติมเรซิน 100 มก.เขย่า 45 นาที ที่ 4°ซ. แยก supernatant ออกจากเรซิน วัดกัมมันตภาพทั้งสองส่วน ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 ก,4 ข,4ค,และ4ง. และเขียนกราฟจากผลของแต่ละชุดระหว่างอัตราส่วน f ต่อ b และปริมาณชัยรอกซินความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบการใช้เวลาการอินคิวเบทสารต่าง ๆ กันในรูปที่ 8

จะเห็นว่า

ถ้าอินคิวเบท60นาทีจะมีstatistical error=2.55% sensitivity=73 พิโคกรัม/มล.
ถ้าอินคิวเบท45นาทีจะมีstatistical error=3.00% sensitivity=74 พิโคกรัม/มล.
ถ้าอินคิวเบท30นาทีจะมีstatistical error=3.90% sensitivity=83 พิโคกรัม/มล.
ถ้าอินคิวเบท15นาทีจะมีstatistical error=4.54% sensitivity=85.6พิโคกรัม/มล.

จะเห็นว่าเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกริยาระหว่างฮอร์โมนชัยรอกซินและโปรตีนอินเตอร์-แอลฟา โกลบูลินนั้น จะเห็นว่าถ้าใช้เวลามากอัตราส่วน f ต่อ b จะน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากเวลายิ่งใช้ในการอินคิวเบทนาน ฮอร์โมนก็ยิ่งทำปฏิกริยากับโปรตีนมากขึ้น แต่จะเห็นว่าเวลาทั้ง 4 ช่วงดังกล่าวนี้ จะเห็นว่าถ้าอินคิวเบทถึง 60 นาทีค่า statistical error จะมีค่าน้อยที่สุดคือ 2.55 % และมี sensitivity ต่ำที่สุดคือ 73 พิโคกรัม/มล.ยิ่งกว่านั้นกราฟที่ใช้เวลา 60 นาที จะมีการแปรค่าอัตราส่วน f ต่อ b ในช่วงความเข้มข้น 0-25 นาโนกรัมต่อ 0.5 มล. ดีมากด้วยใช้ประโยชน์ในการวัดฮอร์โมนช่วงนี้ได้ดี ดังนั้น ค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบทสารควรจะเป็น 60 นาที เป็นอย่างต่ำที่สุด

ตารางที่ 4 ก. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาในการอินคิวเบทสาร 60 นาที, statistical error และ sensitivity

ปริมาณเชียรอกซิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา(cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา(cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	3273	206	15.85	15.43	2.75
	3409	227	15.00		
25.00	3207	254	12.60	12.80	1.56
	3289	252	13.00		
12.50	3113	385	8.07	8.57	5.83
	3138	345	9.07		
6.25	3029	531	5.70	5.54	1.25
	2979	546	5.44		
3.12	2763	855	3.23	3.18	1.73
	2677	855	3.12		
1.56	2325	1184	1.97	2.01	2.00
	2365	1159	2.05		
0.00	1741	1745	1.00	0.97	2.82
	1714	1812	0.95		
				เฉลี่ย	2.55

จากกราฟรูปที่ 8 ในเส้นของข้อมูลในตารางที่ 4 ก. วัดความชันของกราฟได้ = 0.72

คำนวณหา $\text{sensitivity} = \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.0255 \times 1000}{0.72 \times 0.5} = 73$ พิโคกรัม/มล.

ตารางที่ 4 ข. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการอินคิวเบทสาร 45 นาที, statistical error และ sensitivity

ปริมาณอินซูลิน (มาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา(cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	3365	176	19.15	17.93	6.55
	3308	197	16.75		
25.00	3384	253	13.35	13.48	0.92
	3350	246	13.60		
12.50	3258	322	10.10	10.15	0.49
	3337	327	10.20		
6.25	3051	523	5.83	6.02	3.13
	3162	509	6.21		
3.12	2918	717	4.06	4.05	0.24
	2939	729	4.04		
1.56	2635	987	2.66	2.55	6.40
	2508	1070	2.34		
0.00	2092	1591	1.31	1.36	3.32
	2128	1518	1.40		
				เฉลี่ย	3.00

จากกราฟรูปที่ 8 กราฟของข้อมูลในตารางที่ 4 ข. วัดความชันของกราฟได้ = 0.81

คำนวณหา

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$$

$$= \frac{0.0300 \times 1000}{0.81 \times 0.5} = 74 \text{ พิโคกรัม/มล.}$$

ตารางที่ 4 ก. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการอินคิวเบทสาร 30 นาที, statistical error และ sensitivity

ปริมาณเซียรอกซิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	statistical error
50.00	3365	144	23.30	21.33	10.20
	3347	173	19.35		
25.00	3295	210	15.65	14.88	5.21
	3431	243	14.10		
12.50	3467	300	11.50	11.08	3.83
	3285	308	10.65		
6.25	3258	370	8.80	8.35	5.38
	3242	410	7.94		
3.12	2995	605	4.95	4.96	0.20
	3072	618	4.97		
1.56	2904	817	3.55	3.54	0.42
	2770	786	3.52		
0.00	2300	1261	1.82	1.78	1.51
	2274	1297	1.76		
				เฉลี่ย	3.90

จากกราฟรูปที่ 8 กราฟของข้อมูลในตารางที่ 4 ก. วัดความชันได้ = 0.94

คำนวณหา $\text{sensitivity} = \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.0390 \times 1000}{0.94 \times 0.5} = 83$ พิโคกรัม/มล.

ตารางที่ 4 ง. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการอินคิวเบทสาร 15 นาที,statistical error และ sensitivity

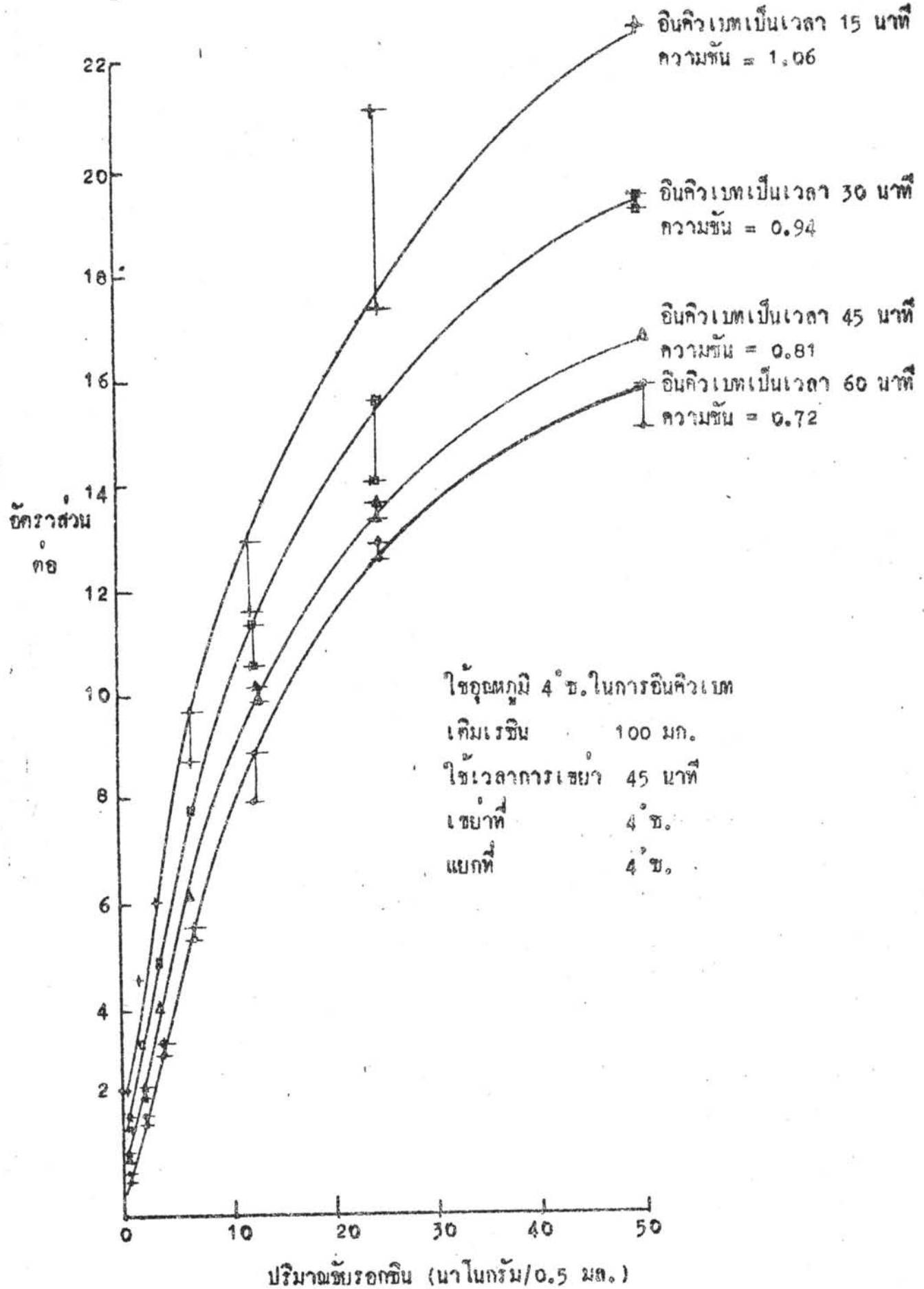
ปริมาณฮัยรอกซิน (นาโนกรัม/0.5ม.ล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	3410	151	22.60	23.30	3.00
	3559	148	24.00		
25.00	3440	163	21.10	18.23	5.34
	3474	200	17.35		
12.50	3321	256	12.98	12.37	4.97
	3326	282	11.75		
6.25	3309	337	9.80	9.28	6.25
	3191	364	8.76		
3.12	3095	504	6.15	6.13	0.40
	3049	498	6.10		
1.56	2982	644	4.64	4.32	7.40
	2880	722	4.00		
0.00	2514	1069	2.37	2.27	4.40
	2389	1108	2.17		
				เฉลี่ย	4.54

จากกราฟรูปที่ 8 กราฟของข้อมูลในตารางที่ 4 ง.วัดความชันได้ = 1.06

คำนวณหา $\text{sensitivity} = \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.0454 \times 1000}{1.06 \times 0.5} = 85.6$ พิโคกรัม/มล.

รูปที่ 8 กราฟแสดงความแตกต่าง เมื่อใช้เวลาในการอินคิวเบทสารผสม 60,45,30,15 นาที



3.2.3 ผลแสดงการ calibrate กราฟมาตรฐาน เมื่อแปรค่าอุณหภูมิในการอินคิวเบท

จากการทดลองกับฮอร์โมนซัยรอกซินมาตรฐาน ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 และ 0 นาโนกรัม/ 0.5 มล. และทำเป็น 2 ชุด และแต่ละหลอดเติม tracer $^{125}I - T_4$ 10 ไมโครลิตร และ binding protein (เจือจาง 1:5; ซีรัม: buffer) 20 ไมโครลิตร อินคิวเบท เป็นเวลา 60 นาที แต่ชุดหนึ่งอินคิวเบทที่ 4 °ซ. อีกชุดหนึ่งทำที่ 23 °ซ. แล้วเติมเรซินหนัก 100 มก. ทุกหลอดเขย่าด้วยเครื่องเขย่า 45 นาที ที่ 4 °ซ. แยก supernatant ออกจากเรซิน วัดกัมมันตภาพรังสีทั้ง 2 ส่วน ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 5 ก. และ 5 ข. และเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วน f ต่อ b และปริมาณฮอร์โมน เพื่อเปรียบเทียบการใช้อุณหภูมิการอินคิวเบทสารต่างกันในรูปที่ 9 จะเห็นว่า

ถ้าอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 4 °ซ.จะมี statistical error 1.85% sensitivity=67.2พิโคกรัม/มล.
ถ้าอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 23 °ซ.จะมีstatistical error 4.04% sensitivity=76.9พิโคกรัม/มล.

ผลการแปรค่าที่ 4 °ซ.จะเห็นว่ามี statistical error น้อยกว่าที่อุณหภูมิห้อง คือ 1.85 % เท่านั้น ในขณะที่อุณหภูมิห้องมีถึง 4.04 % และมี sensitivity ดีกว่าคือ 67.2 พิโคกรัม/มล. ในกราฟรูปที่ 8 จะเห็นว่ากราฟเส้นที่ใช้อุณหภูมิ 4 °ซ.ในช่วงปริมาณซัยรอกซิน 0-25 นาโนกรัม/0.5 มล. จะมีการแปรค่าของอัตราส่วน f ต่อ b เหมาะที่จะใช้วัดปริมาณฮอร์โมนจากซีรัมที่ค่าอัตราส่วน f ต่อ b ต่าง ๆ กัน

ดังนั้น ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอินคิวเบท ควรจะทำที่อุณหภูมิที่มีความสม่ำเสมอตลอดการอินคิวเบท และอยู่ในระดับต่ำคือ ระหว่าง 0-4 °ซ.

ตารางที่ 5 ก. ผลแสดงอัตราส่วน a ต่อ b เมื่อใช้อุดหนูมีในการอินคิวเบท 4 ชม., statistical error และ sensitivity

ปริมาณอินซูลินมนุษย์ (มาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน a ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	3243	214	15.15	15.08	0.46
	3247	215	15.01		
25.00	3351	265	12.64	12.07	4.72
	3241	281	11.50		
12.50	3343	332	10.07	9.93	1.30
	3205	327	9.80		
6.25	3195	427	7.48	7.51	0.53
	3194	423	7.55		
3.12	3124	550	5.68	5.71	0.70
	3105	540	5.75		
1.56	2902	738	3.93	3.89	0.77
	2905	765	3.86		
0.00	2281	1336	1.71	1.72	4.47
	2401	1281	1.87		
				เฉลี่ย	1.85

จากกราฟรูปที่ 9 กราฟของข้อมูลในตารางที่ 5 ก. วัดความชันได้ = 0.55

คำนวณหา sensitivity $= \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.0185 \times 1000}{0.55 \times 0.5} = 67.2$ พิโคกรัม/มล.

ตารางที่ 5 ข. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้อุณหภูมิในการอินคิวเบท 23 °ซ., statistical error และ sensitivity

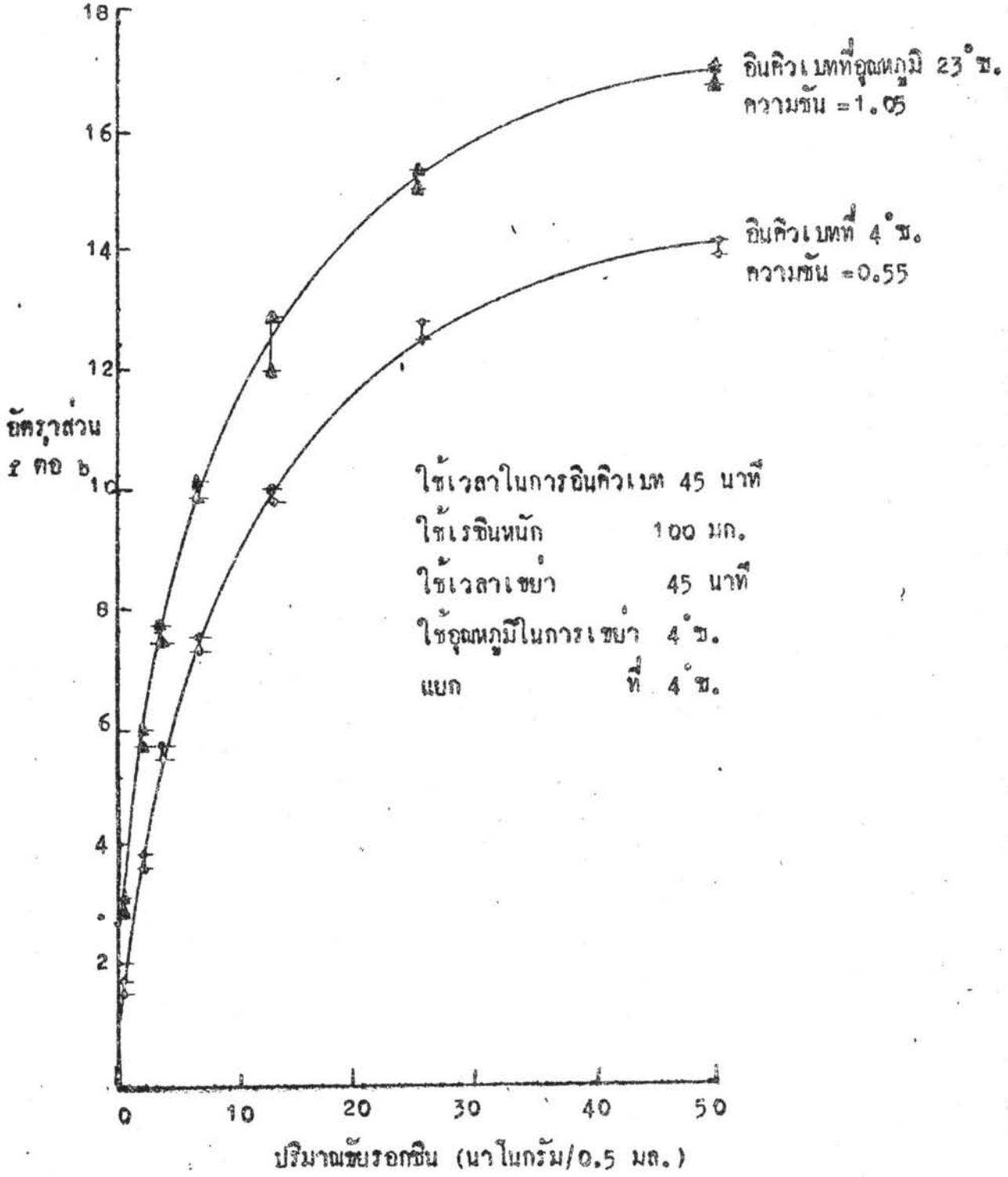
ปริมาณฮับรอกซิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา( )(cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา( )(cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	3248	229	15.02	16.21	6.72
	3414	198	17.02		
25.00	3436	229	15.07	14.54	3.64
	3421	244	14.01		
12.50	3440	285	12.01	12.58	4.10
	3546	270	13.10		
6.25	3453	329	10.50	10.25	2.34
	3205	319	10.01		
3.12	3305	433	7.62	7.34	3.81
	3279	463	7.06		
1.56	3135	564	5.55	5.84	4.88
	3169	516	6.12		
0.00	2759	855	3.22	3.20	2.81
	2750	862	3.19		
				เฉลี่ย	4.04

จากกราฟในรูปที่ 9 กราฟของข้อมูลในตารางที่ 5 ข. วัดความชันได้ = 1.05

คำนวณหา sensitivity $= \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.04 \times 1000}{1.05 \times 0.5} = 76.9$ พิโคกรัม/มล.

รูปที่ 9 กราฟแสดงความแตกต่าง เมื่อใช้อุณหภูมิในการอินคิวเบทสารผสม 4 °ซ. และ 23 °ซ.



3.2.4 ผลการ calibrate กราฟมาตรฐาน เมื่อแปรค่าเวลาการเขย่าสารเมื่อเติมเรซิน

จากการทดลองกับฮอร์โมนชันรอกซินมาตรฐาน ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 และ 0 นาโนกรัม/0.5 มล. และทำเป็น 4 ชุด แต่ละหลอดเติม $^{125}I - T_4$ 10 ไมโครลิตร และ binding protein (เจือจาง 1:5, ซีรัม ต่อ buffer) 20 ไมโครลิตร อินคิวเบทเป็นเวลา 60 นาที ที่ 4°ซ. แล้วเติมเรซินลงแต่ละหลอด ๆ ละ 100 มก. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 4°ซ. เป็นเวลาต่าง ๆ กันคือ 60, 45, 30, 15 นาที ตามลำดับ 4 ชุด แล้วแยก supernatant ออกจากเรซิน วัดกัมมันตภาพทั้งสองส่วน ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6 ก, 6ข, 6ค. และ 6ง. และเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วน f ต่อ b และปริมาณชันรอกซิน เปรียบเทียบการเขย่าสารที่เวลาต่าง ๆ กันในรูปที่ 10

ถ้าเขย่า 60 นาทีจะมี statistical error=1.74% มี sensitivity=69.6 พิโคกรัม/มล.
ถ้าเขย่า 45 นาทีจะมี statistical error=1.81% มี sensitivity=75.4 พิโคกรัม/มล.
ถ้าเขย่า 30 นาทีจะมี statistical error=1.99% มี sensitivity=97 พิโคกรัม/มล.
ถ้าเขย่า 15 นาทีจะมี statistical error=1.83% มี sensitivity=104.5 พิโคกรัม/มล.

จะเห็นว่าเมื่อใช้เวลา 45 นาทีหรือ 60 นาทีในการเขย่าจะมี statistical error น้อยคือ 45 นาที มีเพียง 1.81% และ 60 นาที มี 1.74% และค่า sensitivity ของการเขย่า 45 นาที 75.4 พิโคกรัม/มล. ในขณะที่ 60 นาที มี sensitivity=69.6 พิโคกรัม/มล.

ดังนั้น เวลาที่ใช้ในการเขย่า จึงควรเลือก **ในช่วง 45-60 นาที**

ตารางที่ 6 ก. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการเขย่าสาร (หลังจากเติมเรซิน)60 นาที, statistical error และ sensitivity

ปริมาณซัยรอกซิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	6275	282	22.25	22.25	0.02
	6390	287	22.26		
25.00	6845	389	17.56	17.56	0.11
	6472	368	17.58		
12.50	6350	511	12.42	12.26	1.30
	6113	504	12.10		
6.25	5626	754	7.46	7.34	1.63
	5790	803	7.22		
3.13	5308	1208	4.40	4.35	1.15
	5527	1281	4.30		
1.56	4872	1707	2.86	2.68	6.71
	4816	1922	2.50		
0.00	4015	3287	1.22	1.21	1.21
	3785	3180	1.19		
				เฉลี่ย	1.74

จากกราฟในรูปที่ 10 กราฟของข้อมูลในตารางที่ 6 ก. วัดความชันได้ = 0.50

คำนวณหา sensitivity $= \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.0174 \times 1000}{0.50 \times 0.5} = 69.6$ พิโคกรัม/มล.

ตารางที่ 6 ข. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการเขย่าสาร (หลังจากเติมเรซิน) 45 นาที, statistical error และ sensitivity

ปริมาณอินซูลิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	6388	327	19.50	19.75	1.26
	6367	317	20.01		
25.00	6413	382	16.78	16.64	0.84
	6452	391	16.50		
12.50	6447	585	11.02	11.16	1.25
	6053	534	11.30		
6.25	5759	807	7.12	7.18	0.83
	5827	817	7.25		
3.13	5522	1433	3.85	3.93	2.03
	5651	1557	4.01		
1.56	4871	2050	2.38	2.46	3.25
	5289	2086	2.54		
0.00	4045	3407	1.19	1.23	3.25
	3908	3061	1.27		
				เฉลี่ย	1.81

จากกราฟในรูปที่ 10 กราฟของข้อมูลในตารางที่ 6 ข. วัดความชันได้ = 0.48

คำนวณหา sensitivity $= \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.0181 \times 1000}{0.48 \times 0.5} = 75.4$ พิโคกรัม/มล.

ตารางที่ 6 ค. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการเขย่าสาร (หลังจากเติมเรซิน) 30 นาที, statistical error และ sensitivity

ปริมาณเชียรอกซิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	6205	368	17.35	17.46	0.80
	6289	357	17.60		
25.00	6198	415	14.90	14.65	1.70
	5895	409	14.40		
12.50	6351	662	9.60	9.65	0.51
	6070	628	9.70		
6.25	5717	957	5.97	5.89	1.19
	5528	949	5.82		
3.13	5274	1348	3.93	3.84	2.34
	5330	1427	3.75		
1.56	4985	1821	2.74	2.66	3.00
	4927	1911	2.58		
0.00	3894	2999	1.30	1.37	5.11
	3927	2712	1.44		
			เฉลี่ย		1.99

จากกราฟในรูปที่ 10 กราฟของข้อมูลในตาราง 6 ค. วัดความชันได้ = 0.41

คำนวณหา

$$\text{sensitivity} = \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$$

$$= \frac{0.0199 \times 1000}{0.41 \times 0.5} = 97 \text{ พิโคกรัม/มล.}$$

ตารางที่ 6 ง. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้เวลาการเซย่าสาร (หลังจากเติมเรซิน)15 นาที,statistic error และ sensitivity

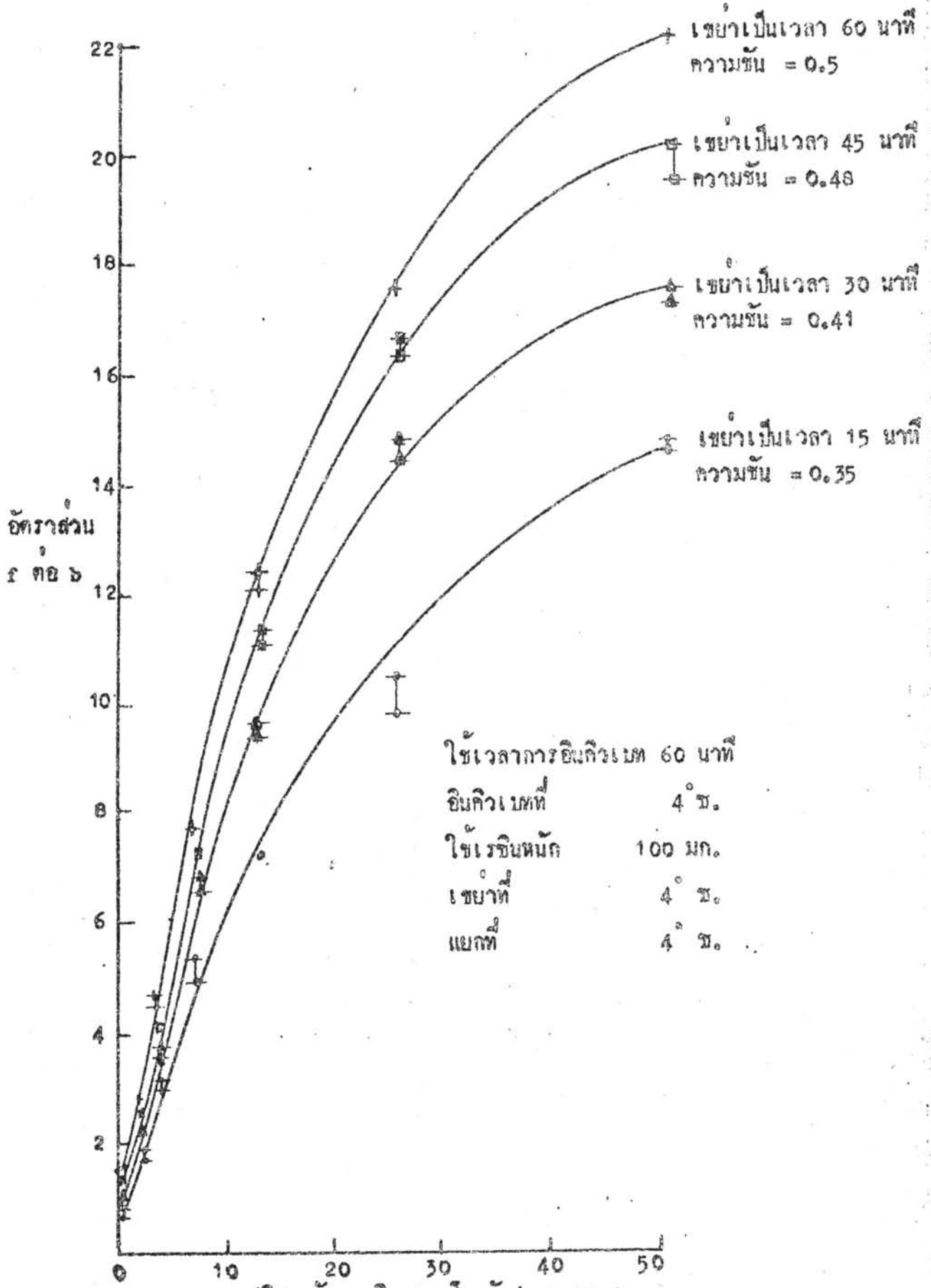
ปริมาณซัยรอกซิน (นาโนกรัม/0.5มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	%statistical error
50.00	6310	426	14.81	14.70	0.67
	6328	432	14.60		
25.00	5972	606	9.85	10.18	3.24
	5406	519	10.51		
12.50	5632	765	7.35	7.35	0.00
	5815	767	7.35		
6.25	5728	1057	5.45	5.21	4.60
	5627	1131	4.97		
3.13	5170	1523	3.40	3.34	1.79
	5216	1591	3.28		
1.56	4648	2298	2.02	1.95	1.57
	4375	2337	1.88		
0.00	3394	3303	1.03	1.03	0.97
	3160	3390	0.94		
				เฉลี่ย	1.83

จากกราฟรูปที่ 10 กราฟของข้อมูลในตารางที่ 6 ง. วัดความชันได้ 0.35

คำนวณหา $\text{sensitivity} = \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.0183 \times 1000}{0.35 \times 0.5} = 104.5$ พิโคกรัม/มล.

รูปที่ 10 กราฟแสดงความแตกต่าง เมื่อใช้เวลาการเขย่าหลังจากเติมเรซิน 60,45, 30,15 นาที



3.2.5 ผลการ calibrate กราฟมาตรฐาน เมื่อแปรค่าอุณหภูมิการเขย่า

จากการทดลองกับฮอร์โมนชัยรอกซินมาตรฐาน ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 50,25,12.5, 6.25,3.13, 1.56, 0 นาโนกรัม/0.5 มล. และทำเป็น 2 ชุด แต่ละหลอดเติม ^{125}I-T_4 10 ไมโครลิตร และ binding protein (เจือจาง 1 : 5; ซีรัม : buffer) 20 ไมโครลิตร อินคิวเบทที่ 60 นาที ที่ 4 °ซ. แล้วเติมเรซิน 100 มก. ลงแต่ละหลอด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 45 นาที ชุดหนึ่งเขย่าที่ 4 °ซ. อีกชุดหนึ่งเขย่าที่ 23 °ซ. นำมาแยก supernatant ออกจากเรซิน วัดกัมมันตภาพรังสีทั้งสองส่วน ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7ก, และ 7ข. และเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วน f ต่อ b กับปริมาณชัยรอกซิน เปรียบเทียบอุณหภูมิการเขย่าต่าง ๆ กันในรูปที่ 11

จะเห็นว่า เมื่อใช้อุณหภูมิการเขย่าสารที่ 4 °ซ. จะมี statistical error = 1.54% และมี sensitivity = 81 พิโกกรัม/มล. แต่ถ้าทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 23 °ซ. ผลที่ได้จะเขียนกราฟไม่ได้เลย เพราะปริมาณกัมมันตภาพรังสี f และ b ที่ได้ไม่เป็นอัตราส่วนเป็นระเบียบ จึงเขียนความสัมพันธ์ออกมาเป็นเส้นกราฟไม่ได้ อีกทั้ง statistical error ก็มีค่าสูงมาก ดูได้จากตารางที่ 7ข.

ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมจะใช้เขย่าสาร เมื่อเติมเรซินลงไปหลังจากอินคิวเบทสารผสมแล้วนั้นควรใช้ที่ 4 °ซ.

ตารางที่ 7 ก. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้อุณหภูมิในการเขย่าสาร (หลังจากเติมเรซิน) 4 °ซ., statistical error และ sensitivity

ปริมาณยูรอกซิน (นาโนกรัม/0.5 มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	% statistical error
50.00	3774	321	11.75	11.80	0.42
	3799	319	11.85		
25.00	3781	377	10.01	9.55	4.70
	3673	404	9.10		
12.50	3483	447	7.80	7.75	0.65
	3707	479	7.70		
6.25	3552	678	5.25	5.15	1.90
	3477	688	5.05		
3.13	3152	959	3.29	3.31	0.90
	3060	919	3.34		
1.56	2831	1288	2.21	2.24	1.30
	2877	1262	2.28		
0.00	2133	2009	1.06	1.07	0.90
	2122	1944	1.09		
				ค่าเฉลี่ย	1.54

จากกราฟรูปที่ 11 กราฟของข้อมูลในตารางที่ 7 ก. วัดความชันได้ 0.38

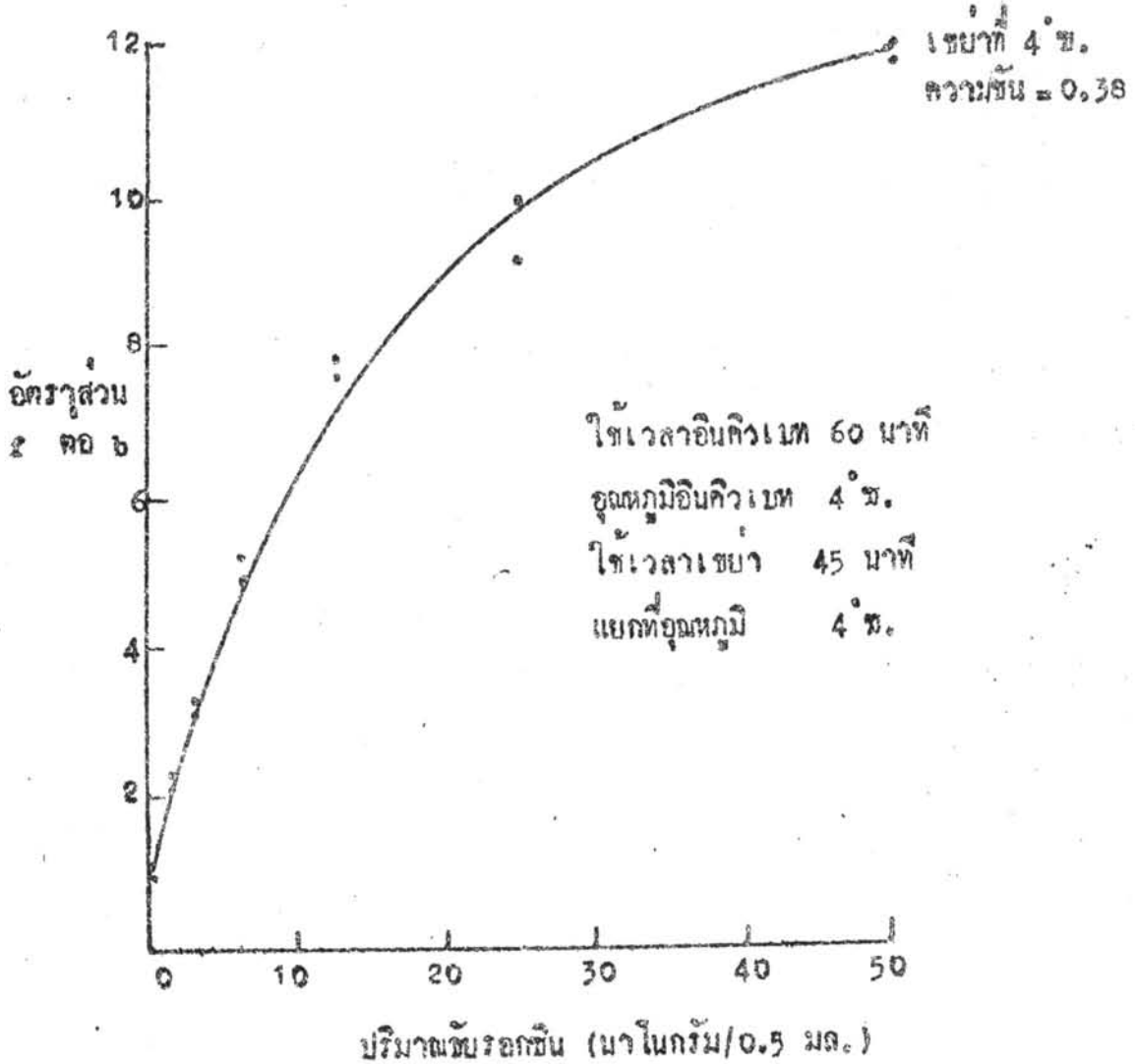
คำนวณหา sensitivity $= \frac{\text{statistical error}}{\text{slope}}$

$= \frac{0.0154 \times 1000}{0.38 \times 0.5} = 81$ พิโคกรัม/มล.

ตารางที่ 7 ข. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้อุณหภูมิ 23 °ซ. ในการเขย่าหลังจากเติมเรซิน

ปริมาณยับรอกซิน (นาโน กรัม/0.5 มล.)	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b
50.00	3893	100	38.93
	3888	86	45.10
25.00	3846	103	37.20
	3839	111	34.50
12.50	3891	111	35.00
	3862	97	39.80
6.25	3935	94	41.80
	3774	124	30.20
3.13	3998	109	36.60
	3924	114	34.40
1.56	3937	132	29.80
	3812	141	27.10
0.00	3905	137	28.40
	3626	221	16.40

รูปที่ 11 กราฟแสดงการแปรค่าของ f ต่อ b เมื่อใช้อุณหภูมิ 4 °ซ. ในการเขย่าสาร หลังจากเติมเรซิน



3.2.6 <u>การหาความแตกต่างในการแยก supernatant (ส่วนที่ฮอร์โมนและโปรตีนทำปฏิกริยากัน) ออกจากเรซิน (ส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา) เมื่อใช้เวลาและอุณหภูมิต่างกัน แต่ใช้ฮอร์โมนธัยรอกซินมาตรฐานที่มีความเข้มข้นเดียวกันตลอด</u>

จาก serial dilution ของธัยรอกซินมาตรฐาน ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 50-0 นาโนกรัม/0.5 มล. ได้เลือกใช้เพียงความเข้มข้นเดียวคือ 6.25 นาโนกรัม/0.5มล. นำมาใส่หลอดทดลอง 18 หลอด หลอดละ 0.5 มล. ความเข้มข้นหลอดละ 6.25 นาโนกรัม แบ่งเป็น 2 ชุด ๆ ละ 9 หลอด เติม ^{125}I-T_4 หลอดละ 10 ไมโครลิตรและ binding protein หลอดละ 20 ไมโครลิตร อินคิวเบท 1 ชั่วโมงที่ 4 °ซ. เติมเรซินหลอดละ 100มก. เขย่าเป็นเวลา 45 นาทีที่ 4 °ซ. แล้วนำมาแยก supernatant ออกจากเรซินโดยแช่หลอดทดลองขณะแยกใช้อุณหภูมิและเวลาการแยกต่างกัน คือชุดหนึ่งแช่ในแท่งคที่อุณหภูมิ 4 °ซ.อีกชุดหนึ่งวางไว้ในอุณหภูมิห้อง (23 °ซ.) เวลาการแยก แยกในนาทีแรก นาทีที่ 30,60 ตามลำดับ แยกครั้งละ 3 หลอด

วัดกัมมันตภาพรังสีของทั้ง 2 ส่วน หาอัตราส่วน f ต่อ b คำนวณหา standard deviation ของอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อใช้อุณหภูมิและเวลาการแยกต่างกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 8ก,8ข. ซึ่งพอจะสรุปได้ว่า ถ้าทำการแยกในที่ที่มีอุณหภูมิ 4 °ซ.จากนาทีแรกถึงนาทีที่ 60 จะได้ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วน f ต่อ b 6.44 $\pm$2.02% ถ้าเทียบเปอร์เซ็นต์ของค่าอัตราส่วน f ต่อ b ที่ผิดไป จากนาทีแรกถึงนาทีที่ 30 มีค่า = 3.7% แต่จากนาทีแรกถึงนาทีที่ 60 มีค่าผิดไป 0.77 % ซึ่งจะเห็นว่าเป็นค่าความคลาดเคลื่อนที่น้อยมาก แต่ถ้าแยกที่อุณหภูมิห้องจะวัดอัตราส่วนระหว่าง f ต่อ b ได้ค่าเฉลี่ยจากนาทีแรกถึงนาทีที่ 60 = 6.36 $\pm$ 8.33 % ถ้าเทียบเปอร์เซ็นต์ของค่าอัตราส่วน f ต่อ b ที่ผิดไปจากนาทีแรกถึงนาทีที่ 30 มีค่าผิดไป =13.7 % และจาก นาทีแรกถึงนาทีที่ 60 มีค่าผิดไป 22.7 %

ดังนั้น จึงควรจะเลือกแยกในที่ที่มีอุณหภูมิที่ 4 °ซ.หรือต่ำถึง 0 °ซ. และให้สม่ำเสมอตลอดการแยก จะทำให้มีค่าคลาดเคลื่อนน้อย

ตารางที่ 8 ก. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อแยก supernatant ออกจากไรซิน ใช้เวลาต่าง ๆ กัน และทำที่อุณหภูมิ 4°ซ. ตลอดการแยกแต่ทำกับชันรอกซิแมทรานความเข้มข้น 6.25 นาโนกรัม/0.5 มล.เท่านั้น

นาทีที่แยก	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	mean deviation (MD)	$(MD)^2$
นาทีแรก	3055	472	6.46			
	3139	483	6.47	6.50	0.06	0.0036
	3100	470	6.59			
นาทีที่ 30	3268	522	6.22			
	3338	540	6.33	6.26	0.18	0.3240
	3191	510	6.25			
นาทีที่ 60	3366	502	6.68			
	3517	543	6.47	6.55	0.11	0.0124
	3398	520	6.52			
			ค่าเฉลี่ย	6.44	S.D.	2.02%

ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน f ต่อ b ตั้งแต่แยกนาทีแรกถึงนาทีที่ 60 = 6.44 $\pm$ 2.02 %

เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนในการแยกนาทีแรกถึงนาทีที่ 30 = 3.70 %

และในนาทีแรกถึงนาทีที่ 60 = 0.77 %

ตารางที่ 8 ข. ผลแสดงอัตราส่วน f ต่อ b เมื่อแยก supernatant ออกจากเรซิน ใช้เวลาต่าง ๆ กัน และทำที่อุณหภูมิ 23 °ซ. ตลอดการแยกแต่ทำกับชันรอกซินมาตรฐานความเข้มข้น 6.25 นาโนกรัม/0.5 มล. เท่านั้น

นาทีที่แยก	กัมมันตภาพส่วนที่ไม่ทำปฏิกริยา (cpm.)	กัมมันตภาพส่วนที่ทำปฏิกริยา (cpm.)	อัตราส่วน f ต่อ b	ค่าเฉลี่ย	mean deviation (MD)	$(MD)^2$
นาทีแรก	3192	615	5.18			
	3228	557	5.79	5.67	0.69	0.4761
	3147	517	6.06			
นาทีที่ 30	3469	506	6.84			
	3461	576	6.00	6.43	0.09	0.0081
	3434	526	6.53			
นาทีที่ 60	3577	518	6.89			
	3400	520	6.55	6.96	0.51	0.2601
	3475	467	7.44			
			เฉลี่ย	6.36	S.D.	8.33 %

ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน f ต่อ b ตั้งแต่แยกนาทีแรกถึงนาทีที่ 60 = 6.36 ± 8.33 %

เปอร์เซ็นต์ความคลาดเคลื่อนในการแยกนาทีแรกถึงนาทีที่ 30 = 13.70 %

และในนาทีแรกถึงนาทีที่ 60 = 22.70 %

3.3 Reproducibility ของวิธีการทดลอง

3.3.1 Precision ของวิธีการทดลอง

ก. ความแตกต่างของปริมาณอินซูลินใน pooled serum เมื่อทำการทดลองพร้อม ๆ กันหลาย ๆ ตัวอย่าง (within assay)

ได้ทดลองหาระดับอินซูลินพร้อม ๆ กันจาก pooled serum (ในเรื่องการทดลอง ข้อ 2.5) ซึ่งแบ่งเป็น 4 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 0.2 มล. ได้ค่าเฉลี่ยปริมาณอินซูลิน, ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ความผิดพลาดมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 precision ของวิธีวัดปริมาณอินซูลินใน pooled serum 4 ตัวอย่าง ในเวลาเดียวกัน

pooled serum ตัวอย่างที่	ปริมาณอินซูลิน (ไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์)	ค่าเฉลี่ย $\bar{X}$ (ไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์)	$\pm$ SD. (ไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์)	$\pm$ SE. (ไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์)
1	8.40	8.43	$\pm$ 0.22 (=2.60%)	$\pm$ 0.13 (=1.54%)
2	8.80			
3	8.60			
4	8.25			

ข. <u>ความแตกต่างของปริมาณซัยรอกซินใน pooled serum เมื่อทำการทดลองต่างวันกัน เป็นเวลา 4 วัน</u> (between assay)

ได้ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.5 ต่างวันกัน 4 วัน เพื่อดูความแตกต่างของระดับซัยรอกซินที่วัดได้ ได้แสดงปริมาณซัยรอกซิน เฉลี่ย ($\bar{X}$) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.) ความผิดพลาดมาตรฐาน (SE) ในตารางที่ 10

จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบปริมาณซัยรอกซินเฉลี่ยไม่ต่อกันมาก จึงนับว่าวิธีนี้มี precision ค่อนข้างสูง

ตารางที่ 10 precision ของวิธีวัดปริมาณซัยรอกซินใน pooled serum ต่างวัน 4 วัน

pooled serum ตัวอย่างวันที่	ปริมาณซัยรอกซิน (ไมโครกรัมเปอร์-เซ็นต์)	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) (ไมโครกรัมเปอร์-เซ็นต์)	$\pm$ SD. (ไมโครกรัมเปอร์-เซ็นต์	$\pm$ SE. (ไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์
1	8.06			
2	9.69	8.84	$\pm$ 0.64 (=7.24 %)	$\pm$ 0.32 (=3.62%)
3	9.19			
4	8.43			

3.4 percentage recovery

การหา percentage recovery เป็นการดูว่าวิธีทดลองนี้มี efficiency และ accuracy สูงเพียงใด ในการทดลองจึงต้องทำให้มีสภาวะเหมือนกับทำของจริงทุกประการ ได้ทดลองตามวิธีของ EKins (1969) แบ่งเป็น 3 ตอน

3.4.1 ทำ zero determination เมื่อนำซีรัมที่ใช้ผงถ่านดูดฮอร์โมนออกหมดแล้ว ทดลองหาปริมาณธัยรอกซินตาม ข้อ 2.5 จะพบว่าปริมาณที่วัดได้มีค่าเท่ากับศูนย์จริง จึงนับว่าวิธีนี้ไม่มีค่า blank value เลย

3.4.2 percentage recovery โดยการเติมสารละลายมาตรฐานธัยรอกซินปริมาณต่าง ๆ กัน ลงใน pooled serum ซึ่งทราบปริมาณธัยรอกซินที่มีอยู่แล้วแน่นอน และเตรียมไว้อย่างละ 0.2 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วสกัดปริมาณธัยรอกซินตามวิธีทดลองในข้อ 2.5 ในเรื่องการทดลอง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ recovery ผลการทดลองแสดงให้ดูในตารางที่ 11 ซึ่งได้เปอร์เซ็นต์ recovery = 104.68% ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน(SD.)=± 4.69% และความผิดพลาดมาตรฐาน (SE.) = 2.10%

จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์ recovery ค่อนข้างสูง และมีความเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่มากนัก ดังนั้น วิธีการทดลองนี้จึงจัดว่ามี accuracy สูง

ตารางที่ 11 percentage recovery ที่ได้จากการเติมธัยรอกซินลงใน pooled serum

ปริมาณฮอร์โมนเดิม & ปริมาณฮอร์โมนที่เติม (ไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์)	ปริมาณฮอร์โมนที่วัดได้ (ไมโครกรัมเปอร์เซ็นต์)	% recovery	% recovery (เฉลี่ย)	± SD.%	± SE.%
8.75	8.32	99.64			
6.25	6.03	99.68			
5.03	5.45	108.54	104.68	±4.69	±2.10
5.00	5.21	104.20			
2.50	2.62	104.80			
1.25	1.39	111.20			

3.4.3 percentage extraction recovery

โดยเติม $^{125}I\text{-}T_4$ tracer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปในซีรัม 0.2 มล.ทิ้งไว้ 20 นาที วัดกัมมันตภาพรังสี ออกมามีหน่วยเป็น count ต่อนาที (cpm.) คิดเป็น 100เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 1 มล. เข้าเครื่องเหวี่ยงด้วยแรง 2000 rpm. 10 นาที เก็บไว้เฉพาะsupernatant นำไปเป่าให้แห้งด้วยไนโตรเจนแกส แล้วนำมาเติม barbital buffer (pH 8.6) 1.5 มล. ดูดมาทดลองเพียง 0.5 มล. นำไปวัดกัมมันตภาพรังสี คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ที่สะกัดได้ (ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์ recovery ของปริมาณ 1 ใน 3 ส่วน) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของทั้งหมด (1.5 มล.) ผลการทดลองได้แสดงให้ดูในตารางที่ 12 ซึ่งได้เปอร์เซ็นต์ recovery 74.33 ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.) $\pm$2.31 และความผิดพลาดมาตรฐาน (SE.) $\pm$ 0.94

จะเห็นว่าวิธีนี้เปอร์เซ็นต์ recovery ที่ได้นับว่าสูงพอใช้ และความเบี่ยงเบนมาตรฐานไม่มากนัก ดังนั้นการทดลองนี้จึงจัดว่ามี efficiency ดี

ตารางที่ 12 percentage recovery ของฮอร์โมนที่วัดจากซีรัมโดยเอธิลแอลกอฮอล์และ $^{125}I\text{-}T_4$ tracer

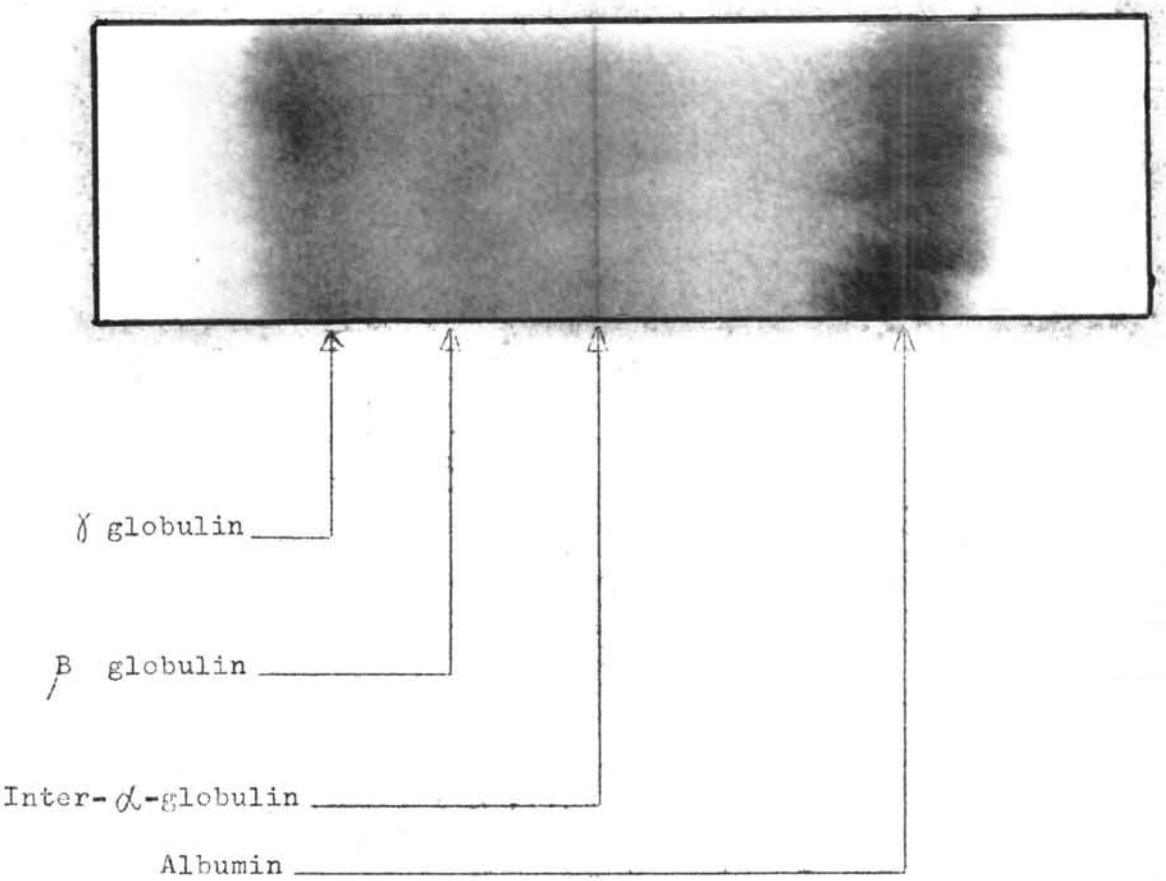
กัมมันตภาพรังสีก่อนสกัด (100%) cpm.	กัมมันตภาพรังสีหลังสกัด (ปริมาณ1ใน3) cpm.	เปอร์เซ็นต์ recovery (ปริมาณ1ใน3)	เปอร์เซ็นต์ recovery ทั้งหมด	เฉลี่ย	SD.	SE.
14921	3762	25.20	75.60			
19249	4797	24.98	74.94			
15491	3679	24.80	74.40			
16830	4068	24.20	72.60	74.33	$\pm$ 2.31	$\pm$0.94
34357	8544	24.90	74.70		(3.07%)	(1.25%)
18061	4663	25.95	77.85			
15491	3615	23.40	70.20			

3.5 ผลการศึกษา thyroxine binding capacity โดย reverse flow electrophoresis

จากการใช้ paper electrophoresis แบบ reverse flow ตามวิธีของ Jacob Robbin(1956) โดยเติม T_4^* (คือ ^{125}I-T_4) 6 ไมโครลิตรลงในซีรัม 34 ไมโครลิตร ในที่สุดมีความเข้มข้น 1.06 ไมโครกรัม/มล. ขึดบนแผ่นกระดาษ แล้วทำการทดลองเป็นเวลา 7 ชั่วโมง จะได้ผลดังรูปที่ 12 และเมื่อนำกระดาษมาตัดเป็น strip เล็ก ๆ วัดกัมมันตภาพรังสีแต่ละชิ้นตามหมายเลขที่กำหนดไว้บนแผ่น จะได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 แล้วนำไปเขียนกราฟดังรูปที่ 13 วัดพื้นที่ใต้กราฟในแถบของอัลบูมินได้ =16.9 ตารางซม. พื้นที่ใต้กราฟแถบของอินเตอร์-แอลฟา โกลบูลินได้ = 12.5 ตารางซม. จะหาปริมาณฮอร์โมนที่จับกับอินเตอร์-แอลฟา โกลบูลิน โดยถือว่าปริมาณฮอร์โมนธัยรอกซินที่เติม 1.06 ไมโครกรัมต่อ มล. เป็นร้อยเปอร์เซ็นต์ ที่จับอยู่ที่อินเตอร์-แอลฟา โกลบูลิน และอัลบูมินเป็นส่วนใหญ่ มีเพียงไม่เกิน 1 % ที่จับเป็น background (Berger และคณะ, 1962; Rich และ Bearn, 1958; Blumberg และ Robbin 1958; Sakurada, 1967)

ดังนั้นจากผลการคำนวณการศึกษานี้ พบว่ามีปริมาณธัยรอกซินในอินเตอร์-แอลฟา-โกลบูลิน = 0.45 ไมโครกรัม/มล.

รูปที่ 12 แสดงตัวอย่างการแยกโปรตีนในซีรัม โดยวิธี reverse flow electrophoresis



ตารางที่ 13 แสดงความสามารถของ TBG โดยใช้ radioimmunoelectrophoresis

เลขที่ของกระดาษ	กัมมันตภาพรังสีของกระดาษ (cpm.)	เลขที่ของกระดาษ	กัมมันตภาพรังสีของกระดาษ (cpm.)
1	191	19	3369
2	109	20	1509
3	131	21	228
4	164	22	218
5	293	23	186
6	503	24	69
7	880	25	44
8	1030	26	181
9	1035	27	20
10	1056	28	192
11	896	29	24
12	721	30	13
13	567	31	107
14	474	32	68
15	361	33	68
16	374	34	55
17	319	35	47
18	1370	36	37

รูปที่ 13 กราฟแสดงการจับของฮับรอกซินกับโปรตีนอินเตอร์-แอลฟาโกลบูลิน